

УДК 616 – 006.04 – 008:616.155.2

©Коллектив авторов

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ТРОМБОЦИТАХ ПРИ ОНКОПАТОЛОГИИ

Э.Г. Горожанская, С.П. Свиридова, В.Н. Байкова, Г.Н. Зубрихина,
М.М. Добровольская, А.В. Сытов*

Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина,
115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел.: (499)-324-16-44, 324-11-14;
факс: (495)-323-57-77; эл.почта: ronc@list.ru, zubrlab@list.ru

С целью определения нарушений в биохимических механизмах свёртывания крови, связанных с окислительным стрессом, были исследованы показатели антиоксидантного статуса в тромбоцитах 57 больных колоректальным раком (у 21 из них – до и после радикальной операции), а также у 40 практически здоровых лиц. Определяли суммарное содержание метаболитов оксида азота (NOx), уровни супероксиддисмутазы (Cu/Zn SOD), глутатиона и малонового диальдегида (МДА). До лечения обнаружены изменения в системе антиоксидантной защиты тромбоцитов, не зависящие от распространённости злокачественного процесса: повышение содержания СОД на 16% ($p < 0,05$), снижение уровня глутатиона и МДА в 5,2 и 1,7 раза, соответственно. Уровень NOx не отличался от нормы. В послеоперационном периоде были обнаружены существенные сдвиги, которые заключались в достоверном увеличении генерации NOx как на 3-й, так и на 10-й день после операции (медиана составила 9,3 при норме 7,0 мкмоль/мг белка тромбоцитов). Эти изменения отражают, по-видимому, реакцию тромбоцитов на воспалительный процесс, связанный с операционной травмой, и подтверждают свойство NOx как медиатора воспаления. Содержание СОД после операции было незначительно снижено и к 10-му дню отмечалось повышение его уровня до исходного. Несмотря на достоверное повышение числа тромбоцитов, корреляционных связей изучаемых показателей и их агрегационной способностью не обнаружено.

Полученные данные свидетельствуют о метаболических расстройствах в сосудисто-тромбоцитарном звене гемостаза, связанных с окислительным стрессом, что даёт основание для дальнейшего изучения взаимосвязи онкологического заболевания с тромбообразованием.

Ключевые слова: тромбоциты, оксид азота, супероксиддисмутаза, глутатион, колоректальный рак.

DOI: 10.18097/PBMC20156104519

ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных причин смерти среди пациентов с опухолевыми заболеваниями заключается в нарушении функционирования свёртывающей системы крови, приводящее к гиперкоагуляции и развитию тромбозов и тромбоземболий, частота которых существенно увеличивается при противоопухолевом лечении [1, 2]. Активация коагуляции при раке – комплексный феномен различных путей взаимодействия опухолевых клеток со всеми компонентами системы гемостаза за счёт: 1) продуцирования прокоагулянтных веществ; 2) высвобождения цитокинов; 3) прямого взаимодействия с эндотелиальными клетками; 4) взаимодействия с эритроцитами, моноцитами/макрофагами и тромбоцитами. Нарушение функции эндотелия у онкологических

больных, проявляющееся подавлением синтеза антитромбогенных факторов и повышенным синтезом протромбогенных, а также индукцией адгезии и агрегации тромбоцитов, имеют существенное значение для формирования сосудистых тромбов [3, 4]. Изменения в сосудисто-тромбоцитарном звене гемостаза в патогенезе активизации свёртывающей системы в большей степени зависят не от числа тромбоцитов, а от их функциональной активности, обусловленных структурно-биохимическими нарушениями [5, 6].

У онкологических больных активация системы гемокоагуляции нередко может быть первым клиническим проявлением злокачественного заболевания [3, 4]. Более того, при впервые выявленном венозном тромбозе в 20% случаев

* - адресат для переписки

обнаруживают онкологическое заболевание [3]. Тем не менее, в настоящее время нет однозначного ответа, почему у онкологических больных повышается риск развития венозных тромботических осложнений. Сам по себе тромбоз при злокачественной патологии, по-видимому, не связан с нарушенной биологией раковой клетки, и в свете современных представлений его рассматривают как побочное явление сложного и эффективного механизма обратной связи, направленного на поддержание и усиление роста опухоли [3, 7]. Предполагается, что система гемостаза и онкологический процесс могут взаимодействовать, образуя “порочный круг”, в котором раковые клетки служат источником прокоагулянтных компонентов, что не только приводит к нарушению баланса в системе гемостаза, но и способствует росту и диссеминации опухолевого процесса [3, 7, 8].

Согласно современным представлениям, основным метаболическим синдромом, способствующим развитию многочисленных морфофункциональных нарушений при большинстве заболеваний, в том числе и онкологических, является окислительный стресс [9, 10]. Активация свободнорадикальных окислительных процессов, сопровождающаяся нарушением биологических барьеров клеточных мембран, не может не отражаться на системе гемостаза, включая метаболизм форменных элементов крови. Очевидно, что развитие окислительного стресса может явиться одним из основных факторов повышения риска тромбообразования, тем более, что окислительные реакции с участием свободных радикалов рассматриваются в настоящее время как необходимый процесс в регуляции клеточного метаболизма [9-11]. Каскад активации тромбоцитов, включая опосредованное рецепторами взаимодействие с повреждённым эндотелием, повышение адгезии, агрегации, приводящие к образованию тромбов, жёстко регулируется [5]. Показано, что повышенный уровень гидро- и липопероксидов способствует гиперактивности тромбоцитов. Более того, тромбоциты сами могут генерировать активные кислородные метаболиты (АКМ) и принимать участие в окислительно-восстановительных процессах, изменяющих их функциональные свойства и содействующих антитромбоцитарным эффектам оксида азота, ингибируя процесс агрегации [5, 12]. В то же время, избыточный выход АКМ из сосудистой стенки может косвенно влиять на активность тромбоцитов путём утилизации оксида азота, уменьшая тем самым антитромбоцитарные свойства эндотелия. В настоящее время точно установлено, что оксид азота, продуцируемый эндотелием, является ключевым механизмом ингибирования агрегации тромбоцитов и вазоконстрикции, связанных с тромбозом. Повышение его концентрации подавляет функцию тромбоцитов, что оказывает благоприятное действие на агрегацию и адгезию тромбоцитов и предотвращает тромбоз [12, 13].

Статистические исследования последних лет выявили тенденцию к значительному росту заболеваемости колоректальным раком. Показано,

что по распространённости в России эта локализация занимает в настоящее время второе место [14]. У большинства онкологических больных, в том числе и у больных колоректальным раком, ещё до начала лечения нередко обнаруживаются изменения в системе кроветворения (анемия), тромбофилия (с увеличением агрегационной способности тромбоцитов и концентрации фибриногена), а в послеоперационном периоде у 80% больных раком толстой кишки возникает риск развития серьёзных тромбоэмболических осложнений. Изменения периферической крови, нарушения функциональной способности тромбоцитов оказывают негативное влияние на эффективность лечения этой категории больных. В связи с этим представляются необходимыми исследования, позволяющие оценить у больных колоректальным раком функционально-метаболическое состояние тромбоцитов, непосредственно участвующих в процессе образования тромбоцитарного сгустка. Есть основания полагать, что оперативное и лекарственное лечение может инициировать окислительный стресс в тромбоцитах, что является дополнительным фактором риска гиперкоагуляции и флелотромбозов. Отсюда следует, что изучение механизмов нарушений функционально-метаболического статуса тромбоцитов имеет важное значение как для лечения расстройств в системе свёртывания крови онкологических больных, так и для профилактики осложнений, возникающих в процессе противоопухолевого лечения.

МЕТОДИКА

Изучены показатели антиоксидантной системы тромбоцитов у 57 больных колоректальным раком с локализацией процесса в прямой (32) и толстой кишке (25). Из них у 21 были обнаружены метастазы в печень, у остальных (36) больных метастазы выявлены не были. У 21 больного с метастазами в печень была IV стадия процесса, у остальных (36) – II-IIIА. Возраст больных составил $(52,3 \pm 2,7)$ года с колебаниями 20-80 лет. Кроме того показатели антиоксидантного статуса были изучены в тромбоцитах больных (21), оперированных по поводу колоректального рака, в до и послеоперационном периоде (3 и 10 суток после операции). В качестве контроля были обследованы 40 практически здоровых людей в возрасте 25-60 лет. Все обследованные дали информированное согласие на участие в исследовании, которое было одобрено этическим комитетом РОНЦ имени Н.Н. Блохина.

Антиоксидантный статус изучали в тромбоцитах, выделенных из 10 мл свежезвзятой крови с добавлением гепарина. После центрифугирования осадок отмывали глюкозо-солевым буферным раствором Tyrode pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1,0 mM MgCl₂, 0,4 mM Na₂HPO₄, 0,35% БСА, 10 mM Hepes, 5,5 mM глюкоза) и лизировали холодной дистиллированной водой. В полученной пробе определяли содержание белка по методу Bradford [15],

а также уровень показателей окислительного стресса: суммарное содержание метаболитов оксида азота (NOx), уровень супероксиддисмутазы (Cu/ZnSOD) и малонового диальдегида (МДА), а также содержание глутатиона.

Уровень метаболитов оксида азота NOx (суммарную концентрацию нитратов и нитритов) определяли колориметрически с использованием тест-набора и микропланшетного ридера на аппарате Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer (Финляндия) при 546 нм по азо-красителю, образуемому в реакции с реактивом Грисса. Этот тест определяет общее количество метаболитов NOx, так как основан на предварительном ферментном восстановлении нитрата в нитрит с участием фермента нитратредуктазы [16]. Результаты выражали в мкмоль на мг белка тромбоцитов.

Одновременно изучали содержание супероксиддисмутазы (СОД), уровень малонового диальдегида (МДА) и глутатиона. Содержание Cu/ZnSOD измеряли тест-набором для иммуноферментного анализа, который основан на фотометрии ферментного комплекса, образованного при связывании молекул СОД с пероксидазным конъюгатом моноклональных антител [17]. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 450 нм микропланшетным методом на аппарате Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer, результаты выражали в нг на мг белка тромбоцитов. Уровень МДА определяли общепринятым методом, основанным на образовании окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты [18]. Содержание МДА измеряли при длине волны 532 нм на спектрофотометре Beckman DU-650 (США). Результаты представляли в мкмоль на мг белка тромбоцитов. Содержание глутатиона определяли спектрофотометрически при 340 нм по реакции с 5,5-дитио-бис(2-нитро-бензойной кислотой) после 20 мин. инкубации в присутствии глутатионредуктазы и NADPH [19]. Результаты выражали в мкмоль на мг белка тромбоцитов.

Агрегационную способность тромбоцитов определяли на агрегометре фирмы "Chrono-Log" (США).

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программы "Statistica 6" непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ произведен методом Спирмена. Результаты в таблицах представлены в виде средних ($\bar{X} \pm m$), медиан и квартилей ($C_{25} - C_{75}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В тромбоцитах здоровых людей функционирует полностью сбалансированная система антиоксидантной защиты, что является результатом согласованной работы её отдельных звеньев, отвечающих за генерацию супероксид-анион радикалов и обеспечивающих защиту структуры биологических

мембран. Достоверная корреляционная зависимость была выявлена между СОД и МДА ($r=0,43$; $p=0,038$), между NOx и МДА ($r=0,33$; $p=0,03$), а также между СОД и глутатионом ($r=0,6$; $p=0,0005$). Установлена также чёткая обратная корреляция между содержанием NOx и СОД ($r=-0,67$; $p=0,024$). Следует отметить, что абсолютные значения показателей, характеризующих активность свободнорадикальных процессов в тромбоцитах, невелики по сравнению с другими форменными элементами крови, в частности с эритроцитами и гранулоцитами, что вполне согласуется с их низкой метаболической активностью и способностью нарабатывать АКМ [20].

Сравнительный анализ результатов, полученных при исследовании показателей антиоксидантной системы тромбоцитов больных с первично выявленным колоректальным раком и практически здоровых людей, выявил чёткие различия между ними, которые носили разнонаправленный характер. Так, содержание СОД, основного фермента, защищающего клетку от супероксид-аниона, было повышенным на 16% ($p<0,05$) по сравнению с нормой, тогда как содержание МДА и глутатиона оказались достоверно сниженными в 1,7 и 5,2 раза, соответственно ($p<0,05$). При этом уровень NOx не отличался от нормы и был равен $7,7 \pm 0,3$ мкмоль/мг белка тромбоцитов, при нормальных значениях $7,8 \pm 0,4$ мкмоль/мг (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о нарушениях в механизме антиоксидантной защиты в тромбоцитах больных в ответ на развитие окислительного стресса, что может оказать влияние на их функциональные свойства.

При анализе полученных результатов, прежде всего, обращает на себя внимание повышение по сравнению с нормой содержания СОД, которое обычно рассматривается как адаптивная реакция, направленная на защиту клеточных структур от продуктов перекисного окисления липидов и нормализацию процесса свободнорадикального окисления [9-11]. Как известно, основная функция СОД заключается в регуляции концентрации супероксид-аниона путём ускорения реакции дисмутации. Известно также, что СОД и каталаза подавляют накопление оксидантов и уменьшают повреждение мембранных структур [9]. Кроме того, защитное действие СОД связано и с её свойством предотвращать инактивацию NO, способствовать его накоплению и уменьшать тем самым агрегацию тромбоцитов и лейкоцитов [6, 9]. Участие оксида азота в функционировании системы гемостаза заключается в его способности предотвращать агрегацию и адгезию тромбоцитов, связанную с продукцией АКМ. Известно, что увеличение продукции супероксид-аниона при окислительном стрессе отражается на функциональной активности тромбоцитов и повышает степень их агрегационной способности [6]. Отсюда следует, что высокая активность СОД инактивирует разрушающее действие супероксида, тогда как при снижении активности фермента его защитные свойства уменьшаются и возникает неблагоприятное для организма избыточное содержание супероксид-

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ТРОМБОЦИТАХ ПРИ ОНКОПАТОЛОГИИ

Таблица 1. Показатели системы антиоксидантной защиты в тромбоцитах здоровых людей и больных колоректальным раком.

Исследуемые группы Показатели	Здоровые люди (n=40)	Больные колоректальным раком (n=57)	Из них	
			Больные без метастазов (n=36)	Больные с метастазами (n=21)
NOx (мкМ)				
X±m	7,8±0,4	7,7±0,3	7,9±0,3	7,6±0,2
медиана	7,0	7,0	7,0	7,0
C ₂₅ -C ₇₅	5,8-9,0	5,5-9,6	5,5-9,3	5,3-9,7
СОД (нг/мл)				
X±m	27,5±0,9	31,9±1,5*	33,6±1,4	29,2±1,3**
медиана	23,8	32,3	35,1	29,2
C ₂₅ -C ₇₅	17,8-44,4	20,8-42,8	22,9-44,8	20,6-36,4
МДА (мкМ)				
X±m	1,56±0,3	0,93±0,1*	0,94±0,2	0,92±0,1
медиана	1,46	0,67	0,66	0,63
C ₂₅ -C ₇₅	0,95-2,49	0,51-0,91	0,51-0,85	0,51-0,98
Глутатион (мкМ)				
X±m	0,13±0,01	0,025±0,001*	0,024±0,01	0,026±0,01
медиана	0,12	0,023	0,023	0,026
C ₂₅ -C ₇₅	0,08-0,21	0,02-0,03	0,02-0,03	0,02-0,03
Агрегация, мм				
X±m	65±1,9	69,4±1,6	69,7±1,5	68,9±1,4
медиана	65	69	70	69
C ₂₅ -C ₇₅	60-78	65-78	60-81	60-76
Тромбоциты (×10⁹/л)				
X±m	257±13	348±15*	353±18	339±15
медиана	254	315	339	287
C ₂₅ -C ₇₅	210-315	263-407	259-414	278-384

Примечание. Результаты рассчитаны на мг белка тромбоцитов: * - p<0,01 по сравнению с показателями здоровых; ** - p<0,05 по сравнению с показателями больных без метастазов.

радикала, который реагирует с NO, образуя токсичный пероксинитрит. Образование пероксинитрита является связующим звеном между NO и системой генерации в клетках АКМ и играет существенную роль в развитии окислительного стресса. При этом снижается концентрация NO и ослабляются его антитромбиновые свойства, что инициирует процесс агрегации [6, 12, 21]. Весьма вероятно, что именно повышенная активности СОД и конкуренция за супероксид-радикал является одной из причин накопления NO и торможения степени агрегации тромбоцитов. В противоположность этому, при недостаточной концентрации СОД и снижении её антиоксидантной активности происходит повышение содержания супероксида. Взаимодействие супероксид-радикала с NO приводит к образованию токсичного пероксинитрита, повреждающего эндотелий сосудов, и к уменьшению содержания NO, инициируя процесс адгезии и агрегации тромбоцитов [9, 21]. При этом создаются условия не только для повышения агрегационной активности

тромбоцитов, но и (что очень важно) для повреждения эндотелия сосудов, поскольку пероксинитрит ингибирует эндотелиальные изоформы NO-синтазы, способствуя развитию дисфункции эндотелия, и одновременно активизирует окислительный стресс [6, 12, 21], что усиливает риск тромбоза.

Наиболее существенным результатом исследования оказались данные о содержании NOx в тромбоцитах больных колоректальным раком. Прежде всего, не было выявлено различий в содержании NOx между здоровыми и больными. Более того уровни NOx в тромбоцитах больных с метастазами и без них также не различались между собой. Медиана этого метаболита была одинакова во всех исследуемых группах, независимо от процесса метастазирования, и составляла 7,0 мкмоль/мг белка (табл. 1). По-видимому, генерация NO в тромбоцитах не связана напрямую со злокачественностью процесса. В настоящее время механизм зависимости продукции NO в тромбоцитах от этиологии и патогенеза заболевания трудно объяснить,

хотя в литературе имеются сведения об изменениях генерации NO в тромбоцитах при различной патологии. Так, Голиков с соавт. [22] наблюдали гиперпродукцию NOx тромбоцитами при ранениях груди и живота ($11,45 \pm 0,84$ мкмоль/л), но ими же отмечено достоверное снижение его в тромбоцитах больных бронхиальной астмой до $5,32 \pm 0,27$ мкмоль/л при норме $7,70 \pm 0,55$ мкмоль/л [23]. По мнению авторов, генерация NO повышается при тяжёлой степени травматической болезни и увеличение его продукции связано с развитием активного воспалительного процесса при острых состояниях организма. Высокая генерация NO в тромбоцитах была выявлена также при нефропатиях с выраженной активностью воспалительного процесса в почках, что позволило рассматривать NO как “мощный медиатор воспаления” [24]. Принимая во внимание, что уровень NO в организме тесно связан с различными воспалительными процессами, определение его содержания может служить дополнительным критерием оценки степени воспаления как “маркера воспалительной реакции”, тем более, что имеется достаточное количество работ, указывающих на повышение продукции NO при различных патологических состояниях, сопровождающихся воспалением [25, 26]. Будучи включённым в механизмы воспаления, NO играет двойственную как провоспалительную, так и противовоспалительную роль. Это связано с тем, что NO-синтаза контролирует биосинтез интерлейкинов (ИЛ-4, ИЛ-11, ИЛ-13), которые относятся к ингибиторам воспалительной реакции, и NO оказывается “подлинным” регулятором воспаления [25]. Можно предположить, что стабильно нормальный уровень NO у данной обследованной группы больных колоректальным раком определяется отсутствием у них острого воспалительного процесса. Действительно, клинические данные и показатели лабораторных исследований не выявили признаков воспаления в организме и были в пределах нормы. Вместе с тем, биосинтез тромбоцитарного NO следует рассматривать в связи с его участием в функциональном статусе тромбоцитов и непосредственном влиянии на процессы гемостаза, поскольку его концентрация является определяющим фактором в регуляции агрегационной функции тромбоцитов, способным предотвращать тромбоз [6, 12, 13]. При исследовании степени агрегации у больных колоректальным раком не было выявлено никаких достоверных отклонений от нормы как у больных с метастазами, так и при их отсутствии (табл. 1). Не было обнаружено достоверной корреляции между степенью агрегации и исследуемыми показателями. В то же время число тромбоцитов у больных оказалось существенно (на 35,4%) выше нормы ($p < 0,01$) (табл. 1). Несмотря на то, что в последние годы появляются сведения о том, что тромбоциты содействуют метастазированию и ангиогенезу [7, 8], окончательно этот вопрос не решён, и взаимосвязь опухолевого процесса с числом тромбоцитов и их функционально-метаболическими свойствами не определена.

В свете современных представлений, исключительно важными оказались исследования роли глутатиона в нарушениях гемостаза у онкологических больных. Ранее было установлено, что ведущая роль в инактивации пероксидов в злокачественных клетках принадлежит системе глутатиона. При этом во всех исследованных опухолях содержание глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов были достоверно выше, чем в соответствующих нормальных тканях [27]. Однако исследования содержания глутатиона в тромбоцитах больных обнаружили чёткое снижение его уровня (в 5,2 раза) по сравнению с нормальными значениями ($p < 0,001$) (табл. 1). Это наблюдение может оказаться значимым для оценки роли глутатионпероксидазы в процессе агрегации тромбоцитов, так как установлено, что именно этот антиоксидантный фермент (но не СОД и не каталаза) уменьшает уровень гидроперексидей и регулирует способность оксида азота ингибировать агрегацию тромбоцитов [6, 28]. Глутатион является субстратом для группы так называемых глутатион-зависимых ферментов, тесно взаимодействующих между собой и осуществляющих каждый свою функцию [29]. Следовательно, изменение концентрации глутатиона отражается на их активности и сопровождается, как правило, активацией липидной пероксидации [29, 30].

Неожиданными оказались результаты исследования содержания МДА. Согласно многочисленным исследованиям, содержание МДА характеризует степень интенсификации окислительного стресса, и увеличение его продукции оказывает токсическое влияние на внутриклеточные процессы [10, 20]. Однако сравнительный анализ уровня МДА в тромбоцитах обследованных больных выявил снижение его содержания по сравнению с нормой ($p < 0,01$). Можно предположить, что низкие значения МДА могут отражать слабо выраженные нарушения в активности процесса пероксидации в тромбоцитах, и даже незначительное повышение содержания СОД (на 16%) оказывается достаточным для поддержания относительной стабильности процесса образования АКМ. Это подтверждается обнаруженной корреляционной зависимостью между содержанием СОД и МДА ($r = 0,48$, $p = 0,0001$). Агрегация и количество тромбоцитов также оказались в пределах нормы, и между ними была обнаружена обратная корреляционная зависимость ($r = -0,26$, $p = 0,049$).

Существенные изменения в исследуемых показателях удалось обнаружить в тромбоцитах больных в послеоперационном периоде. При сравнительном анализе было обнаружено достоверное увеличение генерации NOx как в раннем послеоперационном периоде (3-й день), так и на 10-й день после операции (табл. 2). В противоположность NO, содержание СОД после операции незначительно уменьшалось, но к 10-му дню продукция этого фермента повышалась, и медиана соответствовала дооперационному уровню. Наблюдалось достоверное повышение

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ТРОМБОЦИТАХ ПРИ ОНКОПАТОЛОГИИ

Таблица 2. Показатели системы антиоксидантной защиты в тромбоцитах больных колоректальным раком в послеоперационном периоде.

Исследуемые группы Показатели	Здоровые люди (n=40)	Больные колоректальным раком		
		До операции (n=21)	После операции	
			3 сутки (n=14)	10 сутки (n=21)
NOx (мкМ)				
X±m	7,8±0,4	7,6±0,4	9,2±0,7**	9,4±0,8**
медиана	7,0	7,0	7,9	9,3
C ₂₅ -C ₇₅	5,8-9,0	6,0-9,1	7,3-9,9	6,0-11,8
СОД (нг/мл)				
X±m	27,5±0,9	32,8±1,5*	28,4±2,3	33,6±1,3
медиана	23,8	32,8	28,1	33,1
C ₂₅ -C ₇₅	17,8-44,4	20,5-40,5	16,5-36,0	20,5-47,5
МДА (мкМ)				
X±m	1,56±0,3	0,95±0,1*	1,0±0,1	0,7±0,08
медиана	1,46	0,71	0,76	0,68
C ₂₅ -C ₇₅	0,95-2,49	0,61-0,91	0,65-1,24	0,61-0,79
Агрегация, мм				
X±m	65±1,9	71,1±2,0*	67,7±2,9	70,3±2,8
медиана	65	71	66	72
C ₂₅ -C ₇₅	60-78	60-75	63-72	64-75
Тромбоциты (×10⁹/л)				
X±m	257±13	340±20*	312±30	441±40**
медиана	254	316	322	405
C ₂₅ -C ₇₅	210-315	275-365	248-374	353-501

Примечание. Результаты рассчитаны на мг белка тромбоцитов: * - p<0,01 по сравнению с показателями здоровых; ** - p<0,05 по сравнению с показателями до операции.

содержания тромбоцитов, но корреляционных связей изучаемых показателей с числом тромбоцитов и их агрегационной способностью обнаружено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что тромбоциты играют ведущую роль в запуске процесса тромбообразования и их участие в системе гемостаза хорошо изучено, нет достаточно чётких сведений о взаимосвязи метаболических нарушений в тромбоцитах с их функциональной активностью при развитии патологии, в том числе и при онкопатологии. В настоящее время имеются сведения, что окислительный стресс и избыточный выход АКМ из сосудистой стенки может косвенно влиять на активность тромбоцитов путём утилизации оксида азота с образованием пероксинитрита и токсическим влиянием на эндотелий, уменьшая антитромбоцитарные свойства эндотелия. Анализ полученных результатов обнаружил изменения в системе антиоксидантной защиты тромбоцитов больных колоректальным раком по сравнению с нормой, не зависящие от распространённости злокачественного процесса и заключающиеся в повышении содержания СОД, снижении уровня

глутатиона и стабильности концентрации оксида азота. Выявлено достоверное повышение числа тромбоцитов, но их агрегационная активность колебалась в пределах нормы. Корреляционных связей изучаемых показателей с числом тромбоцитов и их агрегационной способностью обнаружено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соимова О.В., Маджуга А.В., Елизарова А.Л., Зубрихина Г.Н. (2008) Клинич. онкогематол., 1(3), 266-272.
2. Platek C., O'Connel C., Liebman H. (2012) Exp. Rev. Hematol., 5(2), 201-209.
3. Кириенко А.И., Панченко Е.П., Андрияшкин В.В. (2012) Венозный тромбоз в практике терапевта и хирурга. Изд-во "Планида", М. 324 с.
4. Свиридова С.П., Соимова О.В., Сытов А.В., Чугуев Е.С. (2013) Вестник РОНЦ РАМН, №2, 11-20.
5. Ferroni P., Vazzani N., Riondino S., Cuccurullo C., Guadagni F., Davi G. (2012) Antioxid. Redox Signal, 17(10), 1447-1485.
6. Freedman J. (2008) Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 28, 11-16.
7. Cho M.S., Bottsford-Miller J., Vasquez H.G., Stone R., Zand B., Kroll M.H., Sood A.K., Afshar-Kharghan V. (2012) Blood, 120(24), 4869-4872.

8. *Labelle M., Begum S., Hynes R.O.* (2011) *Cancer Cell*, **20**(5), 576-590.
9. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А.* (2006) Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты, М., 553 с.
10. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А.* (2008) Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания, Новосибирск, 284 с.
11. *Горожанская Э.Г., Зубрихина Г.Н., Свиридова С.П.* (2010) Свободнорадикальное окисление и основные механизмы антиоксидантной защиты в норме и при злокачественной патологии, М. 45 с.
12. *Freedman J., Loscalzo J.* (2003) *J. Thromb. Haemost.*, **1**(6), 1183-1188.
13. *Wolin M.S.* (2011) *Circulation*, **123**(8), 1923-1924.
14. *Давыдов М.И., Аксель Е.М.* (2011) Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, **22**, 3(85) прил. 1, 172 с.
15. *Шоно Н.И., Баскаева Е.М.* (1989) Лаб. дело, №4, 4-7.
16. *Miles A. et al* (1996) *Meth. Enzymol.*, **268**, 105-109.
17. *Porstmann T., Wietschke R., Schmechta H., Grunow R., Porstmann B., Bleiber R., Pergande M., Stachal S., von Baehr R.* (1988) *Clin. Chim. Acta*, **171**, 1-10.
18. *Uchiyama M., Mihara M.* (1978) *Anal. Bioch.*, **86**(1), 271-278.
19. *Tietze F.* (1969) *Anal. Biochem.*, **27**(3), 502-522.
20. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.* (1997) Усп. совр. биол., **117**(2), 155-171.
21. *Förstermann U.* (2008) *Cardiovasc. Nat. Clin. Pract. Med.*, **5**(6), 338-349.
22. *Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Матвеев С.Б., Давыдов Б.В., Клычникова Е.В., Абакумов М.М., Стоцкая Т.В.* (2003) Вестник РАМН, №4, 23-28.
23. *Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Палеев Н.Р., Стоцкая Т.В.* (2003) *Клин. мед.*, №2, 28-31.
24. *Паунова С.С., Кучеренко А.Г., Марков Х.М., Ревенкова Л.А., Гольцова Н.П., Темерина Е.А., Анохина О.В., Комарь В.И.* (2000) Нефрология и диализ, №1-2, 48-51.
25. *Сомова Л.В., Плехова Н.Г.* (2006) Вестник ДВО РАН, №2, 77-80.
26. *Титов В.Н.* (2007) *Клин. лаб. диагн.*, №2, 23-39.
27. *Горожанская Э.Г., Ларионова В.Б., Зубрихина Г.Н., Кормош Н.Г., Давыдова Т.В., Лактионов К.П.* (2001) *Биохимия*, **66**(2), 273-278.
28. *Freedman J., Frei B., Welch G., Loscalzo J.* (1995) *J. Clin. Invest.*, **96**, 394-400.
29. *Vina J. (ed.)* (1990) *Glutathione metabolism and physiological function*, Boston, 378 p.
30. *Владимиров Ю.А.* (1998) Вестник РАМН, №7, 43-51.

Поступила: 24. 01. 2014.

OXIDATIVE STRESS IN PLATELETS AT AN ONCOPATHOLOGY

E.G. Gorozhanskaya, S.P. Sviridova, V.N. Baykova, G.N. Zubrikhina, M.M. Dobrovolskaya, A.V. Sitov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478 Russia; tel.: (499)-324-16-44, 324-11-14; fax: (495)-323-57-77;
e-mail: ronc@list.ru, zubrlab@list.ru

To determine the biochemical disorders in the blood coagulation mechanism associated with oxidative stress parameters of the antioxidant status were examined in platelets of 57 colorectal cancer patients, (including 21 patients before and after surgery), and 40 healthy individuals. We determined the total content of nitric oxide (NOx), levels of superoxide dismutase (Cu/ZnSOD), glutathione and malondialdehyde (MDA). Before treatment, we observed the changes in the antioxidant defense system of platelets, which did not depend on the prevalence of malignancy: elevated levels of SOD by 16% ($p < 0.05$), reduced glutathione and MDA in 5.2 and 1.7 times, respectively. NOx levels did not differ from the norm. Significant shifts were found in the postoperative period: they consisted of the increase in the generation of NOx both on the third, and on the 10-th day after surgery. These changes reflect apparently platelet response to the inflammatory process associated with the surgical trauma and confirm the role of NOx as a mediator of inflammation. The content of SOD after surgery was significantly reduced, but return to a baseline on the 10-th day. Despite the significant increase in the number of platelets, no correlations of the studied parameters and their aggregation ability were found. The findings suggest that metabolic disorders in vascular-platelet hemostasis are associated with oxidative stress, which provides a basis for further study of the relationship of cancer to thrombosis.

Key words: platelets, nitric oxide, superoxide dismutase, glutathione, colorectal cancer.